

Apostila da Disciplina de

Laboratório de Bioquímica

7500048 – Turma 2023

BACHARELADO EM QUÍMICA

Professor Responsável:

Prof. Dr. Andrei Leitão

Técnico Responsável:

M.Sc. Eduardo

Agosto de 2023

SUMÁRIO

A – Objetivos Gerais das Aulas Práticas de Bioquímica	3
B – Normas Gerais do Laboratório Didático de Bioquímica	3
C – Material do Estudante	3
D – Apostila de Aulas Práticas de Bioquímica.....	3
E – Material Recebido e sua Limpeza.....	3
F - Reagentes	4
G – Execução dos Trabalhos Práticos	4
H – Regras Básicas para a Elaboração dos Relatórios das Aulas Práticas	4
I – Prevenção de Acidentes.....	4
<i>PRÁTICA Nº 1: SAPONIFICAÇÃO</i>	<i>5</i>
I. Objetivos	5
II.1. Obtenção de um sabão	5
II.2. Obtenção de um sabão insolúvel.....	5
II.3. Obtenção de ácidos graxos insolúveis.....	6
II.4. Obtenção de emulsão	6
III. Questões:	6
<i>PRÁTICA Nº 2: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO</i>	<i>7</i>
I. Objetivos	7
II. Extração do amido da batata	7
Material necessário	7
III. Preparação de 100,0mL de uma solução de amido 1% m/v	7
IV. Hidrólise do amido	8
IV.1. Hidrólise ácida do amido	8
IV.2. Hidrólise enzimática do amido.....	8
V. Questões:.....	8
<i>PRÁTICA Nº 3: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA.....</i>	<i>9</i>
I. Objetivos	9
II. Material necessário.....	9
III. Procedimento	9
Extração do DNA da Cebola.....	9
Determinação da concentração do DNA	10
Determinação da estabilidade térmica e da pureza do DNA.....	10
Determinação da massa molecular do DNA por eletroforese em gel de agarose	10
IV. Questões	10
<i>PRÁTICA Nº 4: OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CASEÍNA E A DETERMINAÇÃO DA SUA MASSA MOLECULAR.....</i>	<i>12</i>
I. Objetivos	12
II. Parte I: Obtenção da Caseína.....	12
Procedimento	12
Teste de Fosfato	12
Tarefa: trazer o ϵ e massa molar da caseína α-S1 para a próxima aula.....	12
III. Parte II: Quantificação da Concentração do Precipitado de Caseína.....	13
Material necessário	13
Procedimento	13
Método de absorvância	13
Método Colorimétrico	14
OBS: A concentração de Caseína será necessária para a Parte III da Aula Prática 4. Portanto, ela deverá ser calculada e apresentada no início da próxima aula.....	14

IV. Parte III: Determinação da Massa Molecular da Caseína por Eletroforese em Gel de poliacrilamida/SDS	15
Material necessário	15
Procedimento	15
V. Questões	16
PRÁTICA Nº 5: DETERMINAÇÃO DE K_M E V_{MAX} PARA A HIDRÓLISE DE BAPNA COM TRIPSINA COM E SEM INIBIDOR	17
I. Objetivos	17
II. Soluções a serem preparadas	17
II.1. Solução de BApNA 0,1 mM em 25% de DMSO e tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 ; NaCl 100 mM; CaCl ₂ 10 mM. (Solução fornecida pelo técnico)	17
II.2. Solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl ₂ 10 mM, 25 mL. ..	17
II.3. Solução de tripsina (Solução fornecida pelo técnico).....	17
II.4. Solução de ácido acético glacial 30% v/v.	17
II.5. Solução de Benzamidina 5 mM, 10 mL. (Solução fornecida pelo Técnico).....	18
III. Cinética Enzimática sem Inibidor	18
IV. Cinética Enzimática com Inibidor	19
V. Questões:.....	20
PRÁTICA Nº 6: DETERMINAÇÃO DE PKA DE UM AMINOÁCIDO E EFEITO TAMPÃO	21
I. Objetivos	21
II. Material necessário.....	21
III. Procedimento	21
Parte 1: Determinação do pKa por titulação ácido-base	21
Titulações.....	21
Parte 2: Efeito Tampão.....	22
IV. Questões	22
PRÁTICA Nº 7: SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	23
I. Objetivos	23
II. Solução Eluente	23
Material necessário	23
Procedimento	23
III. Empacotamento das Colunas	23
IV. Identificação dos aminoácidos.....	25
V. Questões:.....	25
PRÁTICA Nº 8: ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES DO OVO	26
I. Objetivos	26
II. Procedimento Experimental.....	26
III. Determinação da porcentagem de proteína na gema.....	26
IV. Determinação da porcentagem de lipídeos da gema.....	26
V. Determinação da porcentagem de proteína na clara	26
VI. Determinação do ponto isoelétrico da albumina do ovo	27
VII. Precipitação da albumina do ovo	27
VIII. Questões	28

INTRODUÇÃO

A – Objetivos Gerais das Aulas Práticas de Bioquímica

As aulas práticas de Bioquímica têm como objetivo criar condições para que os estudantes sejam capazes, ao final do curso, de:

1. Manipular equipamentos frequentemente utilizados em laboratórios de bioquímica.
2. Conhecer, por meio de reações efetuadas no laboratório, as propriedades químicas das substâncias que compõem os organismos vivos.
3. Interpretar os resultados experimentais.

B – Normas Gerais do Laboratório Didático de Bioquímica

1. Balanças, espectrofotômetros, centrífugas, microscópios ou quaisquer outros aparelhos, somente deverão ser manuseados após instruções, a fim de evitar danos e acidentes.
2. Nos dias e horas destinados aos trabalhos práticos, os estudantes terão à sua disposição professores encarregados de orientá-los na execução e interpretação dos referidos trabalhos.
3. Após o uso de um bico de gás, ou de água, não os deixar abertos inutilmente, tomando o cuidado de fechar as torneiras completamente.
4. Não lançar nas pias quaisquer materiais, com exceção de água, para evitar corrosão.
5. Não lançar nas pias e calhas papel de filtro usado ou quaisquer substâncias sólidas que possam obstruir os encanamentos.
6. Não lançar fósforos acesos nos locais destinados à coleta do lixo.

C – Material do Estudante

Todo estudante deverá trazer, para o trabalho prático, o material abaixo relacionado:

1. Avental (item obrigatório) - necessário para a sua proteção. Não será permitida a presença do aluno sem esse item.
2. Apostila de Aulas Práticas - sem a qual é impossível realizar qualquer trabalho no laboratório.
3. Caneta para retroprojetor - para marcar adequadamente a vidraria durante a execução dos trabalhos práticos.
4. Material para anotações.
5. Não serão permitidos alunos de bermudas, shorts ou saias e sandálias.

D – Apostila de Aulas Práticas de Bioquímica

Constituída de roteiros para a execução do trabalho prático, com exposição completa das marchas das operações. O roteiro de cada trabalho prático deverá ser estudado previamente a fim de possibilitar a sua execução no laboratório. As dúvidas serão resolvidas antes do início dos trabalhos.

O roteiro consta dos seguintes itens:

1. Objetivos específicos - relação dos objetivos que deverão ser alcançados após o término de cada aula.
2. Material necessário - relação do material necessário à execução do trabalho.
3. Procedimento – etapas do trabalho a serem seguidas.
4. Questões sobre as reações, detalhes de técnicas ou cálculos empregados durante o trabalho prático.

E – Material Recebido e sua Limpeza

1. Cada grupo de estudantes receberá o material necessário à execução do trabalho prático.
 - o aluno não deverá utilizar o material de seus colegas, a não ser com autorização prévia.
2. Será exigido dos estudantes o máximo cuidado com o seu lugar na bancada e com o respectivo material.

3. No caso de inutilização ou quebra de algum material recebido, o estudante deverá dar conhecimento aos professores responsáveis pela aula, a fim de se providenciar a sua substituição.
 - o aluno não deverá jogar no lixo o material inutilizado ou quebrado. Deposite-o em local apropriado. Neste caso, chamar o técnico responsável.
4. Terminado o trabalho, o estudante deverá realizar a limpeza de seu lugar, deixando-o em condições de ser utilizado novamente.

F - Reagentes

1. Para cada trabalho prático haverá à disposição dos estudantes uma provisão dos reagentes relacionados nos roteiros;
2. Imediatamente após o uso cada reagente deverá ser colocado em seu lugar adequado;
3. Deve-se tomar cuidado com os vidros de reagentes e as soluções neles contidas, a fim de se evitar contaminações;
4. Não trocar as rolhas;
5. Não retornar ao frasco original as soluções retiradas em excesso;
6. Caso seja autorizado pipetar diretamente do vidro de reagentes, usar sempre uma pipeta limpa.

G – Execução dos Trabalhos Práticos

1. Exige-se para todos os trabalhos práticos a mesma atenção, rigor técnico e disciplina.
2. A inobservância de quaisquer dos requisitos técnicos pode induzir erros que invalidam, parcial ou totalmente, o trabalho realizado, não se levando em conta o desperdício de material, reagentes e tempo.
3. Para que o(a) aluno(a) alcance a eficiência desejada é necessário que ele(a) seja pontual, assíduo(a), ordeiro(a), asseado(a) e tenha conhecimento prévio do trabalho prático a ser executado.

H – Regras Básicas para a Elaboração dos Relatórios das Aulas Práticas

1. Os relatórios deverão ser feitos à **MÃO, LEGÍVEL, BEM ORGANIZADO** e em **TRIO** (com a letra LEGÍVEL de TODOS).
2. Deverão ser entregues, **NO MÁXIMO**, 2 semanas após o término da prática.
3. Os relatórios deverão constar de: 1) Introdução (envolvendo informações TEÓRICAS acerca da prática realizada), 2) Objetivos, 3) Metodologia (material e métodos utilizados), 4) Resultados e Discussão, 5) Conclusão, 6) Referências e 7) Respostas às questões apresentadas.

I – Prevenção de Acidentes

1. Trabalhar sempre protegido por avental, usando calças (jeans de preferência) e sapato fechado.
2. Usar óculos de proteção.
3. Ter o cuidado de não abrir a torneira de gás do bico de Bunsen antes de ter a mão um palito de fósforo aceso.
4. Não utilizar substâncias inflamáveis (álcool, éter, acetona, etc.) nas proximidades de uma chama. Usar banhos de água ou areia.
5. Os reagentes tóxicos e/ou que exalam vapores deverão ser manuseados na capela.

Obs.: NÃO SERÁ PERMITIDA A PRESENÇA DE ESTRANHOS À TURMA DURANTE AS AULAS.

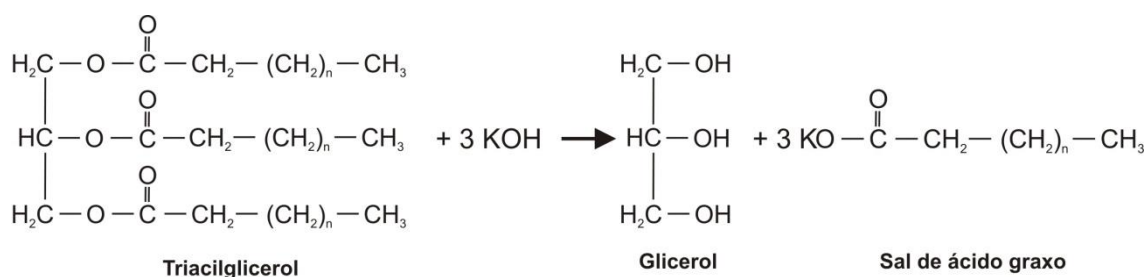
PRÁTICA Nº 1: SAPONIFICAÇÃO

I. Objetivos

Verificar a formação de diferentes produtos reacionais a partir de triacilgliceróis.

Fundamentação:

Triacilgliceróis de origem animal ou vegetal podem ser hidrolisados por soluções fortemente alcalinas, sendo então convertidos em três ácidos graxos e glicerol, conforme esquema abaixo:



II.1. Obtenção de um sabão

Material necessário

- Triglicerídeos (óleo de soja, manteiga, gordura animal, óleo utilizado em fritura, etc.);
- Solução alcoólica de KOH 10%;
- Tubos de ensaio;
- Bico de Bunsen.

Procedimento:

Colocar em um tubo de ensaio grande, 0,8 mL de triglicerídeo.

Adicionar 5 mL da solução alcoólica de KOH 10%.

AQUECER COM CUIDADO NA CHAMA, POIS O REAGENTE É INFLAMÁVEL, mantendo em ebulição branda por 3 minutos.

Acrescentar em seguida 10 mL de água destilada e aquecer por mais 2 minutos.

Verificar se a saponificação foi completa, colocando uma alíquota do sabão em um tubo de ensaio com água. Agite vigorosamente e observe a formação de espuma.

II.2. Obtenção de um sabão insolúvel

Material necessário

- Sabão recém-preparado;
- Soluções de cloreto de cálcio (CaCl_2) 10%;
- Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (fornecido);
- Tubos de ensaio.

Procedimento:

Adicionar em um tubo de ensaio, 40 gotas (2,0 mL) do sabão recém-preparado. Em seguida, adicionar 2,0 mL da solução de cloreto de cálcio. Agite e verifique o que acontece.

Em outro tubo de ensaio, adicione 40 gotas (2,0 mL) do sabão. Em seguida, adicione 2,0 mL da solução de cloreto de sódio. Agite e verifique o que acontece.

II.3. Obtenção de ácidos graxos insolúveis**Material necessário**

- Sabão recém-preparado;
- Béquero de 25 mL;
- Conta gotas;
- HCl concentrado (fornecido)

Procedimento:

Colocar em um béquer pequeno, 3 mL do sabão. Na capela, adicionar ácido clorídrico, gota a gota, com agitação constante.

Observe e descreva o que aconteceu.

II.4. Obtenção de emulsão**Material necessário**

- Triglicerídeos (óleo de soja, manteiga, gordura animal, óleo utilizado em fritura, etc.);
- Sabão recém-preparado;
- Tubos de ensaio.

Procedimento:

Colocar em um tubo de ensaio, 0,5 mL de triglicerídeo. Adicionar 1,5 mL do Sabão recém-preparado. Agitar a suspensão.

Observe e descreva o que aconteceu.

III. Questões:

1. Qual o mecanismo de reação química envolvido nesta prática?
2. O processo é endotérmico ou exotérmico?

PRÁTICA Nº 2: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO

I. Objetivos

Obtenção e caracterização do amido de batata por hidrólise ácida e enzimática.

II. Extração do amido da batata

Material necessário

1 batata média
Folhas de gaze
Solução de HCl concentrado (solução fornecida)
Solução de iodo - fornecida
Reagente de Benedict – fornecido

Procedimento

1. Descascar, picotar e pesar uma batata de tamanho médio, transferindo os pedaços (1 cm³) para um béquer.
2. Adicionar 100,0 mL de água destilada e homogeneizar durante cerca de 30 s com o liquidificador na velocidade máxima.
3. Filtrar em duas folhas de gaze (completamente abertas) dobradas apenas uma vez, recolhendo o filtrado em um béquer de volume apropriado, e espremendo a gaze no final.
4. Deixar o amido depositar no fundo do béquer (+20 min), e a seguir decantar cuidadosamente, desprezando o líquido sobrenadante com uma pipeta Pasteur conectada a uma trompa de vácuo. Caso o amido obtido não esteja completamente branco, lave-o novamente com 100,0 mL de água destilada repetindo, se necessário, a filtração em gaze, e deixando-o depositar para nova decantação (lavar pelo menos 3 vezes).
5. Retirar o líquido sobrenadante e deixar secar no fundo do béquer por um período de uma semana. Manter tampado com papel alumínio perfurado.
6. Pesar e calcular o rendimento.

III. Preparação de 100,0mL de uma solução de amido 1% m/v

1. Pesar amido suficiente para preparar 100 mL de uma solução 1,0% (m/v).
2. Adicionar aproximadamente 25 mL de água destilada fria e agitar fortemente até deixar todo amido em suspensão.
3. Ferver 75 mL de água destilada em um béquer de 250 mL.
4. Adicionar esta suspensão à água em ebulição, lentamente sob agitação constante.
5. Manter o aquecimento e a agitação até que forme uma solução opalescente (transparente).
6. Rotulá-lo como: Solução de amido e o número do grupo.

IV. Hidrólise do amido

IV.1. Hidrólise ácida do amido

1. Colocar um Erlenmeyer contendo 25 mL da solução de amido (1,0%) no banho-maria a ~70°C por 10 min.
2. Retirar 2 mL da mistura para utilizar como branco (fazer dois tubos de branco com 1 mL cada).
3. Adicionar 1 mL de HCl concentrado ao Erlenmeyer (que deve permanecer no banho a 70°C até o final do tempo de coleta), agitar, marcar o tempo (tempo zero) e imediatamente retirar 2 mL da mistura, colocando 1,0 mL em cada um dos dois tubos de ensaio já numerados.
4. Esfriar os dois tubos em água corrente.
5. Adicionar a um dos tubos 2 mL de reagente de Benedict e deixar em banho-maria à quente (~70°C) por, no mínimo, 15 min para testar a presença de sacarídeos redutores.
6. Adicionar ao 2º tubo 3 gotas de solução de iodo e agitar a temperatura ambiente.
7. Repetir o procedimento descrito acima após 5, 10, 20 e 40 min de reação, dividindo cada amostra em dois tubos de ensaio enumerados, procedendo como indicado acima (em um tubo adicione 2 mL do reagente de Benedict e ao outro 3 gotas de solução de iodo)
8. Anotar os resultados.

Obs.: O teste de Benedict e do Iodo devem ser feitos com o branco também.

IV.2. Hidrólise enzimática do amido

1. Coletar 2 mL de saliva em um tubo de ensaio grande.
2. Colocar 15 mL de solução de amido em um segundo tubo de ensaio.
3. A seguir, colocar os dois tubos em banho de água a 37 °C por 10 min para equilibrar as temperaturas da enzima e do substrato.
4. Retirar 2 mL da solução de amido para utilizar como branco (fazer dois tubos de branco com 1 mL cada).
5. Adicionar 0,5 mL de saliva ao tubo contendo amido, agitar, marcar o tempo (tempo zero) e imediatamente retirar 2 mL da mistura, colocando 1,0 mL em cada um dos tubos de ensaio numerados. (Deixar o tubo com o resto da reação em banho de água a 37 °C).
6. Sem demora, adicionar 3 gotas de solução de iodo em um dos dois tubos e agitar.
7. Ao outro tubo, adicionar 2 mL de reagente de Benedict e deixar em banho-maria à quente (~70°C) por, no mínimo, 15 min para testar a presença de sacarídeos redutores.
8. Retirar amostras de 2 mL do tubo de reação após 5, 10, 20 e 40 min, dividindo cada amostra em dois tubos de ensaio e procedendo como indicado acima (em um tubo adicione 2 mL do reagente de Benedict e ao outro 3 gotas de solução de iodo)
9. Anotar os resultados.

V. Questões:

1. Demonstre, com estruturas químicas, a reação de Benedict e do iodo com o amido hidrolisado ou não.
2. Mostre outra reação que possa ser utilizada para determinar qualitativamente a presença do açúcar redutor (com estruturas químicas).
3. Mostre as reações que ocorrem na hidrólise ácida e enzimática do amido com estruturas químicas.

PRÁTICA Nº 3: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA

I. Objetivos

Conhecer as propriedades físico-químicas fundamentais do DNA através da extração do material genético da cebola, a partir dos tecidos do bulbo e de suas propriedades óticas.

II. Material necessário

- 100,0 mL de uma **Solução Extratora** contendo:
 - citrato de sódio 0,15 mol/L
 - dodecil sulfato de sódio 5% m/v
 - NaCl 0,15 mol/L
 - EDTA 0,001 mol/L partindo de uma solução estoque 0,05 mol/L (fornecida).

- 50,0 mL de uma **Solução de Solubilização** Tris-HCl (pH 8) contendo:
 - tris-HCl 0,01 mol/L partindo de uma solução estoque de 0,2 mol/L (fornecida)
 - EDTA 0,001 mol/L partindo de uma solução estoque 0,05 mol/L (fornecida).

III. Procedimento

Extração do DNA da Cebola

1. Aquecer 100 mL da solução extratora, em um béquer plástico de 500 mL, à 60 °C em um banho térmico.
2. Adicionar uma cebola picotada e agitar suavemente por 2 min.
3. Deixar descansar por 15 min nesta temperatura (60°C), a qual não deverá ser ultrapassada.
4. Colocar imediatamente o béquer em banho de gelo até atingir a temperatura entre 15 e 20°C, sempre com agitação suave para permitir o esfriamento homogêneo. O tempo de resfriamento não pode ultrapassar 6 minutos.
5. Agitar por 45 s em baixa velocidade com o auxílio de um agitador magnético, retirar a barra magnética ("pulga") e em seguida agitar por 15 s em alta velocidade com auxílio de um Mixer.
6. Colocar o homogeneizado em um béquer de 500 mL e deixar em repouso por mais 20 min no banho de gelo.
7. Filtrar a mistura utilizando um filtro formado por 4 camadas de gaze (completamente abertas) para um béquer de plástico de 250 mL, tomando cuidado para não deixar passar a espuma. Deixar filtrar por pelo menos 15 min.
8. Colocar o béquer de plástico em banho de gelo até atingir a temperatura entre 10 e 15°C.
9. Resfriar em banho de gelo um volume de etanol 95%. Esse volume de etanol deverá ser o mesmo que o obtido na filtração da etapa anterior.
10. Adicionar ao filtrado o etanol previamente resfriado. Esta adição deve ser lenta com o etanol escorrendo pela parede do béquer, sem agitação.
11. Quando a solução estiver viscosa, utilizar um bastão de vidro para coletar o DNA em suspensão. Para isso, tocar rapidamente a superfície da fase líquida superior com a ponta do bastão e girar o bastão somente em um sentido. A substância aderida ao bastão é o DNA existente nas células da cebola.
12. Colocar o bastão com o DNA dentro de uma proveta de 25,0 mL contendo 5,0 mL da solução de solubilização para dissolver o material.

Determinação da concentração do DNA

1. Medir a solução concentrada de DNA em 260 nm, se a leitura de absorbância for superior a 0,7 diluir a amostra como sugere o restante do procedimento.
2. Diluir em um tubo de ensaio 0,5 mL da solução estoque de DNA preparada anteriormente para 10 mL em solução de solubilização.
3. Agitar suavemente o tubo.
4. Fazer a leitura da absorbância em 260 nm. Um valor de absorbância de 0,5 corresponde a 25 µg da dupla hélice do DNA/mL. Se a leitura de absorbância for maior que 0,7 ou menor que 0,1 → conversar com os responsáveis.

Determinação da estabilidade térmica e da pureza do DNA

1. Dissolver toda a amostra do DNA obtida no item 12 com a solução de solubilização para dar origem a uma solução de DNA de 25 µg/mL. Se persistir a presença de material insolúvel, filtrar a solução utilizando um chumaço de algodão.
2. Transferir para 3 tubos de ensaio alíquotas de pelo menos 2-3 mL cada um, sendo que dois tubos serão aquecidos em banho-Maria (água em ebulição) por 15 min, e o terceiro tubo mantido em temperatura ambiente.
3. Após este período, um dos tubos aquecidos deve ser esfriado rapidamente em banho de gelo por 15 min e o outro tubo deve ser esfriado lentamente em temperatura ambiente.
4. Em temperatura ambiente, fazer uma curva de absorção entre 245 e 320 nm (1 medida a cada 5 nm) dos 3 tubos, usando como branco o tampão de solubilização.
5. Outra informação importante obtida do espectro de UV é referente à pureza da preparação do DNA. Soluções de alta pureza apresentam uma razão de absorbâncias $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

Determinação da massa molecular do DNA por eletroforese em gel de agarose

1. *Preparar o gel de agarose 0,8%*: em um Erlenmeyer dissolver 0,2 g de agarose em 25 mL de tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). Em seguida, colocar por 30 segundos no micro-ondas. Retirar do micro-ondas e agitar. Colocar por mais 10 segundos no micro-ondas. Resfriar em água corrente até que se consiga colocar as mãos (não esfriar totalmente).
2. Verter a solução no suporte para gel e esperar que este fique esbranquiçado e duro (como uma gelatina).
3. Posicionar o gel na cuba e adicionar as amostras já colocadas no corante Blue Green Loading Dye I com o auxílio de uma micropipeta. (1 µL de corante para 10 µL de amostra).
4. Adicionar tampão TAE até cobrir totalmente o gel (a faixa preta no suporte para o gel deve estar voltada para a faixa preta na cuba – polo negativo)
5. Fechar a cuba e conectar os fios vermelho e preto (vermelho com vermelho e preto com preto)
6. Ajustar para aproximadamente 100 – 110 Volts e aguardar a corrida por aproximadamente 30 minutos.
7. Decorrido este tempo, observar utilizando luz UV e analisar.

IV. Questões

1. Por que a presença do SDS, EDTA e NaCl nesta prática?
2. Explique o efeito observado pelo aquecimento da solução aquosa do DNA.
3. A quantidade de DNA encontrada na cebola é condizente com a literatura?
4. Quais as impurezas que podem existir e em qual comprimento que absorve no UV o DNA e as impurezas?
5. Por que o uso de luz UV para revelar as amostras de DNA presentes no gel de agarose?

PRÁTICA Nº 4: OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CASEÍNA E A DETERMINAÇÃO DA SUA MASSA MOLECULAR

I. Objetivos

Obtenção e quantificação da caseína e determinação da sua massa molecular avaliando as principais propriedades físico-químicas de proteínas.

II. Parte I: Obtenção da Caseína

Material necessário

- Solução estoque de HCl (0,1 mol/L)
- 5,0 g de leite em pó

Procedimento

1. Pesar 5,0 g de leite em pó e transferir para um béquer de 250 mL.
2. Adicionar 125 mL de água destilada.
3. Adicionar HCl 0,1 mol/L com auxílio de uma bureta gota a gota sob agitação constante (agitador magnético), até que o pH seja igual a 4,60 (medido no pH-metro).
4. Deixar a caseína sedimentar totalmente.
5. Descartar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur conectada a uma trompa de vácuo.
6. Adicionar 150 mL de água destilada, agitar bem e deixar sedimentar.
7. Repetir esta operação (pelo menos 4 vezes) até que o teste para fosfato solúvel seja negativo (ver técnica no final do texto). Paralelamente, realizar a análise da lactose, conforme abaixo.
8. Filtrar o resíduo resultante em funil de Buchner com o auxílio de um papel de filtro (usar trompa de vácuo para facilitar a filtração). Descartar a água do Kitasato.
9. Antes de secar, transferir com o auxílio de uma espátula, o material do papel de filtro para um béquer de 50 mL e suspender o resíduo em 15 mL de metanol.
10. Filtrar novamente.
11. Após a filtragem, lavar o precipitado (resíduo) 2 vezes com 15 mL de metanol. (Obs.: o filtrado deve ser armazenado em frasco para descarte rotulado corretamente).
12. Pesar uma placa de Petri e anotar sua massa.
13. Após as lavagens, transferir o resíduo para a placa de Petri e adicionar 15 mL de éter (este procedimento deve ser realizado na capela).
14. Agitar e deixar evaporar mexendo com uma espátula, amassar constantemente a caseína até obtenção de um pó fino e seco.

Obs.: não forçar uma evaporação rápida, pois a adsorção de água induzirá a um processo de plastificação da caseína, tornando difícil sua solubilização nas etapas subsequentes. Cobrir a placa com papel alumínio furado para evaporação completa do éter. Manter no dessecador e pesar na próxima aula para o cálculo do rendimento. Coletar informações acerca da composição do leite em pó no rótulo do produto.

Teste de Fosfato

Transferir 2 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução de molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 9% e 2 mL de HNO_3 6 mol/L. O aparecimento de um precipitado de uma coloração amarela indica a presença de fosfato. As lavagens devem ser realizadas até que o teste de fosfato forneça um resultado negativo.

Análise de lactose: Transferir 1 mL do 1º sobrenadante para um tubo de ensaio contendo 2 mL do reagente de Benedict, aquecer até ebulição por 15 min. e analisar.

Tarefa: trazer o ϵ e massa molar da caseína α -S1 para a próxima aula.

III. Parte II: Quantificação da Concentração do Precipitado de Caseína

Material necessário

Tampão borato de sódio 0,2 mol/L, pH 7,6
Solução de caseína 2%
Reagente de Biureto

Procedimento

a) Preparação do tampão borato de sódio 0,2 mol/L pH 7,6 (fornecida)

1. Preparar 100,0 mL de uma solução tampão borato de sódio 0,2 mol/L dissolvendo a massa correspondente de borato de sódio em 75 mL de água destilada (dissolver à quente).
2. Esfriar a solução e ajustar o pH para 7,6 com HCl 3 mol/L (fornecido).
3. Completar o volume para 100,0 mL e checar o pH. Se necessário, ajustá-lo novamente.
4. Guardar essa solução para ser utilizada na prática: Determinação de K_M e V_{max} para a hidrólise de caseína com tripsina.

b) Preparação da solução de caseína 2% m/v

1. Pesar o precipitado obtido na aula anterior.
2. Preparar uma solução de caseína 2% m/v em 25 mL de **Tampão borato** com agitação magnética e aquecimento.
3. Filtrar a solução se necessário, ainda à quente, com o auxílio de um pequeno chumaço de algodão, transferindo a mesma para um béquer de 50 mL.
4. Após esfriar, completar o volume para 25 mL com **Tampão borato** utilizando balão volumétrico.

Método de absorbância

Análise Bioinformática

1. Buscar a sequência de aminoácidos (estrutura primária) da caseína no banco de dados *ExpPASy* (Expert Protein Analysis System - <http://ca.expasy.org/>).
2. Usar a palavra chave "bovine casein" para busca no banco de dados *UniProt Knowledgebase* (Swiss-Prot and TrEMBL).
3. Avaliar as informações disponíveis na página (importante para o relatório).
4. Copiar a sequência de aminoácidos da caseína bovina (dispensar a sequência correspondente ao peptídeo sinal).
5. Colar a sequência de aminoácidos da caseína bovina no campo adequado do site do programa *ProtParam Tool* (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>) para obter parâmetros físico-químicos da caseína bovina, principalmente o valor do coeficiente de extinção molar teórico em 280 nm.
6. Medir a absorbância em 280 nm da amostra de caseína de concentração desconhecida. Utilize o tampão borato como branco. Caso necessário dilua a solução de caseína para que o valor de absorbância fique entre 0,1 e 0,7 unidades (dilua 100 μ L da caseína preparada para um total de 2,5 mL com tampão direto na cubeta para medir).

7. Aplicar a lei de Beer-Lambert para calcular a concentração de caseína na solução estoque. Calcular o conteúdo de caseína no precipitado original e no leite em pó avaliando o rendimento do procedimento de purificação. O resultado deverá ser expresso em porcentagem.

Método Colorimétrico

Curva de calibração da caseína:

1. A partir de uma solução estoque de caseína com **concentração conhecida** (solução padrão fornecida), fazer diluições como mostra a Tabela 1 (seguir a sequência das colunas); ANOTAR CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO.
2. Simultaneamente, proceder com amostra teste de caseína obtida anteriormente (**sua solução**), de acordo com os itens **T1** e **T2** da Tabela 1 a seguir;
3. Após a adição do reagente de Biureto, agitar os tubos para homogeneizar adequadamente em vortex, deixar repousar por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida fazer as leituras no espectrofotômetro em 550 nm; Utilizar o tubo G como branco.
4. Construir uma curva de padronização de absorbância *versus* mg de proteína/mL e calcular a concentração de caseína na solução desconhecida por: (a) interpolação dos valores de absorbância das amostras de concentração desconhecida, ou (b) pelo coeficiente angular encontrado;
5. Calcular o conteúdo de caseína no precipitado original e no leite em pó avaliando o rendimento do procedimento de purificação. O resultado deverá ser expresso em porcentagem.

Tabela 1: Volumes de reagentes adicionados para construção da curva de padronização da caseína.

Tubos	Volume da solução de caseína padrão (mL)	Volume de Tampão Borato (mL)	Volume de Biureto (mL)	proteína mg/mL	Absorbância ($\lambda=550\text{nm}$)
A	1,0	0,0	4,0		
B	0,8	0,2	4,0		
C	0,6	0,4	4,0		
D	0,5	0,5	4,0		
E	0,4	0,6	4,0		
F	0,2	0,8	4,0		
G	0,0	1,0	4,0		
Amostra teste					
T1	1,0	0,0	4,0		
T2	0,5	0,5	4,0		

OBS: A concentração de Caseína será necessária para a Parte III da Aula Prática 4. Portanto, ela deverá ser calculada e apresentada no início da próxima aula.

IV. Parte III: Determinação da Massa Molecular da Caseína por Eletroforese em Gel de poliacrilamida/SDS

Material necessário

Amostra da caseína 2,5 µg/µL
Kit para preparação de gel para eletroforese
Gel previamente preparado
Reagentes para preparação das amostras a serem aplicadas no gel
Marcadores de massa molecular de proteínas
Soluções para revelação do gel
Folha de papel celofane

Procedimento

Preparação da Amostra da caseína 2,5 µg/µL

A amostra é preparada a partir de solução de caseína obtida no início da prática, onde se determinou a concentração pela equação de Lambert-beer.

ATENÇÃO: devido à periculosidade dos reagentes utilizados nesta prática, os procedimentos de preparação do gel de eletroforese serão realizados pelo técnico do Laboratório.

1. Utilizar uma alíquota de 100 µL solução de caseína em um microtubo que deverá ser diluída em água destilada, para que a concentração estoque seja de 2,5 µg/µL.
Obs.: essa diluição deverá ser feita em função da concentração de caseína determinada para sua amostra (demonstrar os cálculos no relatório de aula prática).
2. Desta solução, utiliza-se 100 µL e adiciona-se 100 µL do tampão da amostra (tampão Tris-HCl 0,188 mol/L, pH 6,8 contendo 6% de SDS, EDTA 6 mmol/L, glicerol 30% e azul de bromofenol 0,01% contendo 5 mM de β-mercaptoetanol), tendo-se finalmente uma concentração de 1 µg/µL.
3. Devem ser aplicadas alíquotas de 5 e 10 µl no gel de eletroforese, que é composto de duas partes: gel de empilhamento de concentração de poliacrilamida 5 % e gel de resolução 15%.
4. As condições para eletroforese serão inicialmente desenvolvidas com 20mA e 50V, até que as amostras entrem no gel de resolução, passando-se a 25 mA e 75V. Após o término da eletroforese, as amostras e padrões (ver valores de massas moleculares (MM) para os padrões na tabela 2) migrados serão fixados com solução de etanol:água:ácido acético nas proporções 5:4:1, revelados com corante Comassie Brilhante Azul R-250, e o gel descorado na mesma solução etanol:água:ácido acético.
5. Para secagem, coloca-se o gel e folhas de celofane em uma solução de etanol:glicerol:água 30:3:67 durante pelo menos 4 horas, retira-se a solução e faz-se um sanduíche com o gel entre as folhas de celofane e deixa-se secar.
6. Após revelação do gel, calcular os valores de Rf para os padrões e adicionar na Tabela 2.
7. Construir um gráfico com os valores de log de MM (ordenada) dos padrões de massa molecular versus Rf (abscissa).

$$R_f = \frac{\text{migração de proteína (cm)}}{\text{migração do corante (cm)}}$$

Você deve obter uma reta e, por interpolação dos valores determinados para a caseína, calcular as massas moleculares dos componentes moleculares presentes na sua amostra.

Tabela 2. Marcadores de massa molecular de proteínas.

Proteína	MM (Daltons)	Log MM	Dist.(cm)	Rf
Soroalbumina bovina	66.000			
Ovoalbumina	45.000			
Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase	36.000			
Anidrase carbônica	29.000			
Tripsinogênio	24.000			
Inibidor de Tripsina de soja	20.000			
Lisozima	14.300			
Solvente ou corante	-----	-----		-----

V. Questões

1. Demonstrar a reação de formação da coloração amarela entre a solução de molibdato de amônio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ e HNO_3 na presença de fosfato.
2. O que é o reagente de Biureto e qual é sua reação com proteínas para dar a coloração azul?
3. Qual dos dois métodos aplicados é mais adequado para a determinação da concentração da caseína bovina purificada a partir do leite em pó pelo método de precipitação?
4. Qual foi o rendimento obtido de caseína? Ele está dentro do esperado?
5. Descreva outros métodos para determinação da massa molecular da caseína.
6. Os valores de MM das caseínas encontradas são comparáveis àqueles da literatura? E que tipo de caseína foi encontrado em maior quantidade?
7. A lactose é um açúcar redutor? Explique.

Nota:

Dalton (ou unidade de massa atômica) é a unidade de massa definida como $1/12$ da massa do carbono 12 no estado fundamental.

$$1 \text{ Da} = 1/12 m(^{12}\text{C})$$

O número de átomos em 1 mol é o número de Avogadro (6.023×10^{23}), assim a massa de 1 átomo de carbono é = $(12 / 6.023 \times 10^{23}) \text{ g}$

Isso significa que $1 \text{ Da} (1 \text{ unidade de massa atômica}) = 1/12 \times (12 / 6.023 \times 10^{23}) \text{ g} = 1 / 6.023 \times 10^{23} \text{ g}$, a qual é $\text{g/mol} (1 \text{ MOL} = 6.023 \times 10^{23})$

➡ **1 Da = 1g/mole**

Massa molar é o peso molecular expresso em gramas, assim 1 mol de C-12 é exatamente 12 gramas. Isso significa que $12 \text{ g/mol} = 12 \text{ Daltons}$

Portanto, para converter g/mol em Daltons é só multiplicar por 1.

PRÁTICA Nº 5: DETERMINAÇÃO DE K_M E V_{MAX} PARA A HIDRÓLISE DE BApNA COM TRIPSINA COM E SEM INIBIDOR

I. Objetivos

Determinação da Constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima e K_{cat} da reação de hidrólise de BApNA (**Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida**) pela tripsina. Estudo da influência de um inibidor de tripsina na Constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima da reação e identificação do tipo de inibição.

II. Soluções a serem preparadas

Material necessário

- Tampão Tris-HCl pH 8,0
- BApNA
- Tripsina
- Ácido Acético glacial
- Benzamidina
- DMSO

II.1. Solução de BApNA 0,1 mM em 25% de DMSO e tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 ; NaCl 100 mM; $CaCl_2$ 10 mM. (Solução fornecida pelo técnico)

→ OBS.: Considerar Massa Molecular do BApNA = 434,88 g/mol para os cálculos das concentrações em mol/L.

II.2. Solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; $CaCl_2$ 10 mM, 25 mL.

1. Preparar 25,0 mL de uma solução tampão Tris-HCl 100 mM dissolvendo a massa correspondente de Tris, de NaCl e de $CaCl_2$ em 15 mL de água destilada.
2. Ajustar o pH para 8,0 com HCl 3M (fornecido).
3. Completar o volume para 25,0 mL e checar o pH. Se necessário ajustá-lo novamente.

II.3. Solução de tripsina (Solução fornecida pelo técnico)

Pesar 1,0 mg de tripsina e dissolver em 10,0 mL do tampão Tris 100 mM pH 8,0 previamente preparado.

→ OBS: Considerar Massa Molecular da tripsina = 23,8 KDa ou 23300 g/mol para os cálculos das concentrações em mol/L.

II.4. Solução de ácido acético glacial 30% v/v.

Diluir 3,0 mL de ácido acético glacial em água destilada e completar o volume para 10,0 mL.

CUIDADO! SEMPRE COLOCAR O ÁCIDO NA ÁGUA E NUNCA O INVERSO.

II.5. Solução de Benzamidina 5 mM, 10 mL. (Solução fornecida pelo Técnico)

Diluir 1 mL da solução estoque 50 mM em água destilada e completar o volume para 10 mL em balão volumétrico.

III. Cinética Enzimática sem Inibidor

Pipetar em tubos de ensaio as soluções de tampão Tris-HCl pH 8,0, H₂O e BApNA como mostrado na TABELA I a seguir e então colocar no banho termostático a 37°C por 2 min.

TABELA I

Número do tubo	Tampão Tris-HCl pH8,0 (mL)	H ₂ O (mL)	Volume de BApNA (mL)	Volume de tripsina (mL)	Volume de ácido acético 30% (mL)	Tempo de incubação (min)
1	0,25	0	2,75	0,5	0,5	30
2	0,25	0,25	2,5	0,5	0,5	30
3	0,25	0,75	2,0	0,5	0,5	30
4	0,25	1,25	1,5	0,5	0,5	30
5	0,25	1,75	1,0	0,5	0,5	30
6	0,25	2,25	0,5	0,5	0,5	30
Controle	0,25	0,5	2,75	0	0,5	30

O volume final de reação é 4 mL, após a adição do ácido acético 30%.

ATENÇÃO: Não continuar a prática sem ler previamente o texto abaixo com muita atenção.

→ Após término da montagem dos tubos de 1 a 6, conforme mostrado na TABELA I, adicione 0,5 mL de solução de tripsina no tubo 1 ao tubo 6.

→ Observe um intervalo de 1 minuto entre eles para a adição subsequente da solução de tripsina.

→ Observe o tempo de incubação dos respectivos tubos conforme especificado na TABELA I.

→ Após o devido tempo de incubação de cada tubo individualmente (ver TABELA I), retirar o tubo do banho e adicione 0,5 mL de ácido acético glacial 30% e agite.

Leitura de absorvância

→ Faça as leituras de Absorvância (Abs) das amostras dos tubos 1 ao 6 no espectrofotômetro em 410 nm.

→ Complete assim a Tabela II do relatório.

→ Para calcular a concentração de p-nitroanilida hidrolisada em mol/L consideramos seu coeficiente de extinção molar a 410 nm como sendo $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a equação de Beer-Lambert $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, onde temos que $l = 1 \text{ cm}$ logo:

$$[\text{BApNA hidrolizada}]_x = \frac{((\text{Abs tubo } x))}{(8800)}$$

⇒ Considere a concentração em 4 mL como volume final de incubação

Os valores obtidos, inclusive os de absorbância (Abs), deverão ser colocados na Tabela II do relatório e os dados utilizados para construir o gráfico de Michaelis-Menten e o do Lineweaver-Burk para estimar os valores de V_{max} , K_{cat} e K_m para a hidrólise típica de BApNA.

TABELA II

Tubo	Abs. [@] (UA)	Concentração de BApNA hidrolisada (mol/L)	Tempo de incubação (min)	Velocidade de hidrólise (mol/L.min)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

IV. Cinética Enzimática com Inibidor

Pipetar em tubos de ensaio as soluções de tampão Tris-HCl pH 8,0, H₂O, BApNA e Benzamidina como mostrado na TABELA III a seguir e então colocar no banho termostático a 37°C por 2 min. ATENÇÃO: pipetar a benzamidina na lateral do tubo e verter o tubo para misturar as soluções.

TABELA III

Número do tubo	Tampão Tris-HCl pH8,0 (mL)	H ₂ O (mL)	Volume de BApNA (mL)	Volume de Benzamidina 5 mM (mL)	Volume de tripsina (mL)	Volume de ácido acético 30% (mL)	Tempo de incubação (min)
1	0,25	0	2,75	0,020	0,5	0,5	30
2	0,25	0,25	2,5	0,020	0,5	0,5	30
3	0,25	0,75	2,0	0,020	0,5	0,5	30
4	0,25	1,25	1,5	0,020	0,5	0,5	30
5	0,25	1,75	1,0	0,020	0,5	0,5	30
6	0,25	2,25	0,5	0,020	0,5	0,5	30
Controle	0,25	0,5	2,75	0,020	0	0,5	30

O volume final de reação é 4 mL, após a adição do ácido acético 30%.

ATENÇÃO: Não continuar a prática sem ler previamente o texto abaixo com muita atenção.

→ Após término da montagem dos tubos de 1 a 6, conforme mostrado na TABELA III, adicione 0,5 mL de solução de tripsina no tubo 1 ao tubo 6.

→ Observe um intervalo de 1 minuto entre eles para a adição subsequente da solução de tripsina e o mesmo intervalo após os 30 min para a adição do Ácido acético.

- Observe o tempo de incubação dos respectivos tubos conforme especificado na TABELA III.
- Após o devido tempo de incubação de cada tubo individualmente (ver TABELA III), retirar o tubo do banho e adicione 0,5 mL de ácido acético glacial 30% e agite.

Leitura de absorbância

- Faça as leituras de Absorbância (Abs) das amostras dos tubos 1 ao 6 no espectrofotômetro em 410 nm.
- Complete assim a Tabela IV do relatório.

Os valores obtidos, inclusive as Abs, deverão ser colocados na Tabela IV do relatório e os dados utilizados para construir o gráfico de Michaelis-Menten e o do Lineweaver-Burk para estimar os valores de V_{max} , K_{cat} e K_m para a hidrólise típica de BApNA.

TABELA IV

tubo	Abs. [@] (UA)	Concentração de BApNA hidrolisada (mol/L)	Tempo de incubação (min)	Velocidade de hidrólise (mol/L.min)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

V. Questões:

1. Explique o uso do ácido acético glacial na prática.
2. Que tipo de inibidor é a benzamidina?
3. Sugira o modo de interação do substrato e do inibidor, com a tripsina.

PRÁTICA Nº 6: DETERMINAÇÃO DE PKA DE UM AMINOÁCIDO E EFEITO TAMPÃO

I. Objetivos

Conhecer o efeito tampão de soluções tamponantes. Determinar os pKas da glicina e seu efeito tampão.

II. Material necessário

- 500,0 mL de NaOH 0,05 mol/L (a partir de uma solução estoque fornecida)
- 250 mL de HCl 0,05 mol/L (a partir da solução estoque de HCl 3 mol/L)
- 100 mL de HAc 0,1 mol/L
- 50,0 mL de NH₄OH 0,1 mol/L

Solução de Glicina pH 1,8 (fornecida)

Preparar 50,0 mL de Solução de Glicina 0,1 mol/L pH 1,8

- Dissolver a massa de glicina suficiente para a solução acima em 40,0 mL de água. - Ajustar o pH para 1,8 com **solução de HCl 3 mol/L** (solução fornecida).
- Completar o volume para 50 mL e ajustar o pH para 1,8 novamente, se necessário.

Solução tampão acetato de sódio 0,1mol/L a partir de ácido acético concentrado.

Pipetar volume suficiente para preparar 100 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L em 70 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 4,75 com o auxílio de soluções de NaOH 1,0 mol/L e 0,1 mol/L. Finalmente, completar o volume para 100,0 mL. Se necessário, ajustar novamente o pH.

III. Procedimento

Parte 1: Determinação do pKa por titulação ácido-base

Titulações

- 1) Titulação potenciométrica de 10 mL de NH₄OH 0,1 mol/L com HCl 0,05 mol/L.
- 2) Titulação potenciométrica de 10 mL HAc 0,1 mol/L com NaOH 0,05 mol/L.
- 3) Titulação potenciométrica de 10 mL de Glicina 0,1 mol/L com NaOH 0,05 mol/L

OBS.:

As titulações potenciométricas devem ser realizadas de 0,5 em 0,5 mL até pH 3,5 para a NH₄OH, e até pH 10,5 para o ácido acético e glicina.

Anotar em uma tabela os valores de pH observados em função do volume de titulante adicionado.

Volume adicionado	pH aferido

Volume adicionado	pH aferido

Representar os dados no relatório somente na forma de um gráfico.

Parte 2: Efeito Tampão

Preparar solução tampão acetato 0,1 mol/L pH 4,75. (fornecida)

Medir o volume suficiente para preparar 100 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L em 70 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 4,75 com o auxílio de soluções de NaOH 3,0 mol/L e 0,1 mol/L. Finalmente, completar o volume para 100,0 mL. Aferir novamente o pH e, se necessário, ajustar para 4,75.

1. Preparar, por diluição da solução tampão acetato 0,1 mol/L (pH 4,75) preparada, 50 mL de tampão acetato (pH 4,75) nas seguintes concentrações: 0,05 e 0,01 mol/L.
2. Faça a leitura de pH de 20 mL de cada solução tampão acetato, conforme a Tab. 1, adicionando os volumes indicados de HCl 0,05 mol/L utilizando uma micropipeta. Anote os valores das leituras de pH aferidas antes e após as adições de HCl.
3. Repita o mesmo experimento adicionando NaOH como indicado na tabela 2, preenchendo-a.

Tabela 1. Valores de pH após adição de HCl (0,05 mol/L) em tampão acetato (pH 4,75).

Adição nº	Volume de HCl adicionado (mL)	Volume total de HCl adicionado (mL)	Número de mols de H ⁺ adicionados	pH aferido			
				Tampão acetato pH 4,75 (mol/L)			Água destilada
				0,10	0,05	0,01	
0	0,0						
1º	0,2						
2º	0,3						
3º	0,5						
4º	1,0						

Tabela 2. Valores de pH após adição de NaOH (0,05 mol/L) em tampão acetato (pH 4,75).

Adição nº	Volume de NaOH adicionado (mL)	Volume total de NaOH adicionado (mL)	Número de mols de OH ⁻ adicionados	pH aferido			
				Tampão acetato pH 4,75 (mol/L)			Água destilada
				0,10	0,05	0,01	
0	0,0						
1º	0,2						
2º	0,3						
3º	0,5						
4º	1,0						

IV. Questões

1. Demonstre como você achou os valores dos pKas nos gráficos de titulação potenciométrica.
2. Explique o princípio do funcionamento do pHmetro.
3. Qual é a razão de utilizar o padrão primário para titulação potenciométrica? Explique.
4. Explique se é possível preparar uma solução tampão de cloreto de amônio a pH 4,5.

PRÁTICA Nº 7: SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

I. Objetivos

Separação e identificação de aminoácidos usando resinas de troca catiônica e aniônica e cromatografia em camada delgada.

II. Solução Eluente

Material necessário

Tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,0
Resinas Amberlite de troca catiônica e aniônica
Solução de NaCl 0,1 mol/L (fornecida)
Solução de AgNO₃ 0,01 mol/L (fornecido)
Sílica gel
Solução de ninidrina

Procedimento

Tampão fosfato de sódio (fornecido)

1. Pesar massa suficiente de Na₂HPO₄.2H₂O para preparar 500 mL de uma solução 0,1 mol/L, dissolvendo o sal em 400 mL de água destilada e ajustando o pH para 6,0.
2. Por fim, complete o volume para 500,0 mL e ajuste o pH novamente, se necessário.

ATENÇÃO: É extremamente importante colocar rótulos nos recipientes que contiverem as resinas, para que não haja confusão e perda, já que as resinas são de alto custo.

III. Empacotamento das Colunas

As colunas corresponderão às buretas e as resinas serão Amberlite de troca catiônica e aniônica (de especificação desconhecida).

O empacotamento deverá ser feito como se segue:

1. Com a torneira da coluna fechada, coloque 1/3 do volume de água e em seguida, com o auxílio de um bastão de vidro, introduza um pequeno chumaço de algodão na parte inferior da bureta. (Evite que fique ar preso no mesmo. O algodão servirá de base para resina).
2. Com o auxílio de um funil, adicione a resina até obter uma altura equivalente a 20 cm. (Atenção, é importante que as duas resinas tenham a mesma altura).

III.1. Separação de aminoácidos com a resina de troca catiônica

III.1.1. Determinação do volume morto (V₀) da coluna de troca catiônica

Uma vez empacotada a coluna, deixe o nível da água da parte superior da coluna escoar lentamente até que o mesmo atinja a superfície da resina, mas não a deixe secar, feche a torneira.

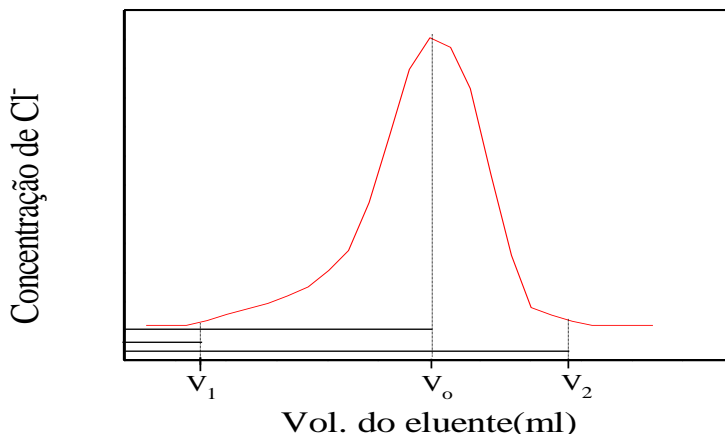
Adicione para o caso da coluna de Amberlite de **troca catiônica** 0,5 mL da solução de NaCl 0,1 mol/L (fornecida), deixe escoar lentamente até atingir novamente a superfície da resina, iniciando a coleta. Lave a superfície com volumes de 0,5 mL de água por duas vezes.

Adicione sobre a resina volumes de água de modo que a resina não seque e continue a eluição, coletando volumes individuais de aproximadamente 0,5 mL, num total de aproximadamente 24 tubos ou mais, cuja coleta deverá ser iniciada ao se aplicar a solução de NaCl na coluna.

Adicione em cada tubo 1 gota de AgNO_3 0,01 mol/L e observe a formação de precipitado. Caso o último tubo ainda apresentar turvação, colete mais 10 tubos e repita o procedimento com a solução de AgNO_3 .

Anote o intervalo de tubos no qual a precipitação ocorreu e os volumes correspondentes ao primeiro tubo onde o precipitado aparece (V_1) e aquele imediatamente anterior ao tubo onde a precipitação não foi mais observada (V_2). V_o , o volume de eluição, é dado por:

$$V_o = V_1 + (V_2 - V_1)/2 \text{ (Observe esquema abaixo).}$$



Uma vez determinado V_o , inicie a passagem de tampão fosfato pH 6,0 até que o pH de saída seja igual ao do eluente.

(ATENÇÃO!! Ajuste o pH da resina no mesmo dia que for utilizá-la!!!).

III.1.2. Separação dos aminoácidos

Obs.: Antes da operação abaixo a coluna deverá ser equilibrada no tampão pH 6,0.

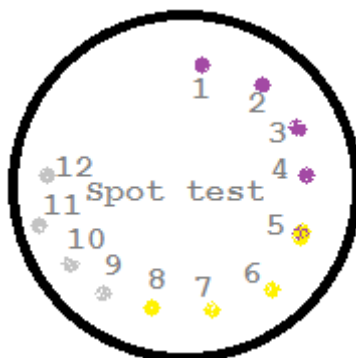
Dissolva sua amostra (fornecida) em 3 mL de tampão fosfato pH 6,0 (Caso não consiga dissolver totalmente a amostra chame o professor ou técnico responsável).

Aplique uma alíquota de 0,5 mL na coluna de resina de **troca catiônica** (reserve o restante da amostra) e adicione volumes de tampão para coletar as amostras.

Inicie a coleta com volumes de ~1,0 mL no intervalo entre V_1 menos 1,0 mL e V_2 .

Faça um "spot test" destas amostras em papel de filtro, e revele com ninidrina.

(ATENÇÃO: Não jogue fora as alíquotas até mostrar os "spot tests" ao professor ou técnico responsável).



III.2. Separação de aminoácidos com a resina de troca aniônica

O procedimento é semelhante ao da coluna de troca catiônica, desde que as duas colunas sejam de mesma dimensão (altura e diâmetro da coluna).

Neste caso, a coluna de resina de troca aniônica é somente equilibrada com tampão fosfato a pH 6,0, que deve ser eluída até que o pH de saída seja igual ao da solução inicial (pH 6,0).

IV. Identificação dos aminoácidos

De ambas as colunas, guarde uma alíquota mais concentrada para determinação dos aminoácidos em mistura por cromatografia de camada delgada (ccd).

Você deverá encontrar na sua amostra, no mínimo 2 aminoácidos, que serão identificados por meio da determinação dos Rfs das amostras desconhecidas e coloração, comparadas com os Rfs e coloração das amostras de aminoácidos padrões.

ATENÇÃO: Não jogue fora as amostras que foram aplicadas na placa de ccd.

A cromatografia será realizada em sílica gel e eluída com n-BuOH:AcOH:H₂O (4:1:1).

As revelações serão obtidas com ninidrina

Obs.: Obtida a sua placa de ccd, antes de qualquer procedimento, converse com os responsáveis.

V. Questões:

1. Quais os aminoácidos encontrados? Por quê?
2. Explique o princípio de separação dos aminoácidos na CCD.
3. Existe outro procedimento para determinação e quantificação dos aminoácidos? Explique apenas um deles.
5. O Vo tem algo a ver com os resultados obtidos pelo "spot test", explique.

PRÁTICA Nº 8: ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES DO OVO

I. Objetivos

No final deste trabalho prático o estudante deverá saber:

1. Determinar experimentalmente a porcentagem de proteína e lipídeos da gema do ovo.
2. Determinar experimentalmente a porcentagem de proteína na clara.
3. Determinar o ponto isoelétrico da albumina.
4. Identificar a presença de proteína em líquido biológico usando sua propriedade de precipitação por agentes físicos e químicos.
5. Determinar experimentalmente o valor calórico aproximado de um ovo.
6. Explicar o significado das reações e operações realizadas.

II. Procedimento Experimental

1. Pesar 2 béqueres de 100 mL.
2. Separar bem a gema da clara e colocar cada uma das partes nos respectivos béqueres.
3. Pesar os béqueres e anotar o peso da gema e da clara.
4. Transferir a clara para um cilindro graduado de 100 mL e anotar o volume.

III. Determinação da porcentagem de proteína na gema

Nota: Durante esta operação não deve haver nenhum bico de gás ligado no laboratório.

1. Adicionar à gema isolada, 15 mL de álcool à 95%. Agitar bem.
2. Adicionar 30 mL de éter. Agitar por 5 minutos.
3. Filtrar para um Erlenmeyer de 125 mL (com um chumaço de algodão).
4. Lavar o precipitado com 3 porções de 10 mL de éter. Adicionar somente nova porção de éter depois do precedente ter sido completamente drenado. Guardar o filtrado.
5. Pesar um papel de filtro.
6. Transferir o precipitado extraído para o papel de filtro desprezando o pedaço de algodão.
7. Secar o precipitado à temperatura ambiente. Não usar a estufa.
8. Pesar o papel de filtrado com o precipitado seco.
9. Calcular a porcentagem de proteínas na gema.
10. Interpretar.

IV. Determinação da porcentagem de lipídeos da gema

1. Pesar um béquer seco de 100 mL.
2. Adicionar 3g de sulfato de sódio anidro ao filtrado obtido em III.4. Agitar por 5 minutos.
3. Filtrar em papel de filtro, recolhendo o filtrado no béquer pesado.
4. Evaporar o solvente em banho de areia.
5. Pesar o béquer com resíduo. Conservar o resíduo.
6. Calcular a porcentagem de lipídeos na gema.
7. Interpretar.

V. Determinação da porcentagem de proteína na clara

1. Transferir 10 mL de clara de ovo para um béquer de 100 mL.
2. Adicionar 15 mL de álcool à 95%. Agitar bem por 2 minutos. Deixar em repouso por mais 3 minutos.
3. Pesar um papel de filtro.
4. Filtrar em papel de filtro pesado previamente. Desprezar o filtrado.

5. Abrir o papel de filtro e levá-lo à estufa para secar completamente.
6. Pesar o papel com o precipitado.
7. Calcular a porcentagem de proteína na clara;
8. Interpretar.

VI. Determinação do ponto isoelétrico da albumina do ovo

Nota: Preparar para esta análise e as subsequentes, uma solução de albumina do ovo a 5%, diluindo 5mL de clara em 95 mL de água destilada.

1. Utilizar 5 tubos de ensaio.
2. Adicionar aos mesmos as soluções, conforme a tabela I.

Tabela I

Tubo	1	2	3	4	5
Acetato de sódio 0,1N (mL)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ácido Acético 0,1N (mL)	0,25	0,50	2,00	--	--
Ácido Acético 1,0N (mL)	--	--	--	0,8	3,20
Água destilada (mL)	3,75	3,50	2,00	3,20	0,80
pH resultante	5,50	5,00	4,50	4,00	3,50
Albumina 5% (mL)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

3. Agitar bem os tubos.
4. Adicionar ao tubo 3, cuidadosamente e com agitação, empregando a pipeta graduada de 10 mL, álcool a 95% até produzir pequena turvação. Anotar a quantidade gasta.
5. Adicionar a mesma quantidade de álcool a cada um dos outros tubos.
6. Deixar em repouso por 10 minutos e anotar em qual dos tubos ocorreu maior formação de precipitado.
7. Interpretar.

VII. Precipitação da albumina do ovo

A - Precipitação pelo calor

1. Colocar 2 mL de solução de albumina preparada em VI em um tubo de ensaio.
2. Aquecer direto na chama. CUIDADO: manter vidros de álcool e éter longe da chama.
3. Observar a formação de precipitado.
4. Interpretar.

B - Precipitação por ácidos fortes – Reação de Heller

1. Colocar 2 mL de solução de albumina em um tubo de ensaio.
2. Acrescentar lentamente, no fundo, 2 mL de ácido acético concentrado. Para isso, introduzir a ponta da pipeta no fundo do tubo de ensaio e deixar escoar o ácido lentamente.

3. Observar a formação de um anel branco na superfície de separação dos dois líquidos.
4. Interpretar.

C - Precipitação por agentes de alcaloides

1. Colocar 2 mL de solução de albumina em um tubo de ensaio.
2. Adicionar 3 gotas de solução saturada de ácido pícrico.
3. Observar o precipitado formado.
4. Interpretar.

VIII. Questões

1. De posse dos dados obtidos nas pesquisas anteriores, calcular o valor calórico do ovo.
2. Qual o ponto isoelétrico da albumina?
3. Por que foi adicionado álcool 95% aos tubos de 1 a 5 da Tabela 1?
4. Em caso de envenenamento por sais de metais pesados, é indicado administrar clara de ovo aos pacientes. Por quê?